

11219

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA
ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES

**BUSQUEDA DE HETERORESISTENCIA A VANCOMICINA DE *Staphylococcus*
COAGULASA NEGATIVA Y SU REPERCUSION CLINICA EN NEONATOS CON
DIAGNOSTICO DE SEPSIS NEONATAL EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
PERINATOLOGIA.**

Para Obtener el Título de Especialista en:
INFECTOLOGIA

Presenta:
Dra. Araceli Ramírez Landín

Profesor Titular del Curso:
Dr. Federico Javier Ortiz Ibarra.

TUTOR DE TESIS:
Dr. Jesús Reyna Figueroa.

COTUTORA:
QBP Graciela Villeda Gabriel.
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

México D. F.


DIRECCION DE ENSEÑANZA

Febrero ~~2005~~
2005

0348645



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE INFECTOLOGIA
DR. FEDERICO JAVIER ORTIZ IBARRA



TUTOR DE TESIS
DR. JESUS REYNA FIGUEROA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Araceli Ramírez Landín

FECHA: Araceli Ramírez Landín

FIRMA: 28/09/18

INDICE.

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	5
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
IV.	JUSTIFICACION	16
V.	OBJETIVOS.	18
VI.	HIPOTESIS	19
VII.	MATERIAL Y METODOS	20
VIII.	RESULTADOS	25
IX.	DISCUSION	27
X.	ANEXOS	31
XI.	BIBLIOGRAFIA.	32

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco y dedico este esfuerzo de varios meses a:

DIOS

Por bendecir acompañar e iluminar cada uno de los 730 días que formé parte de este instituto.

A LOS PACIENTES DEL INPer por que permiten de la manera más noble que aprendamos con lo más valioso que tiene una persona: su vida.

JUAN PABLO.

Bebito eres el bálsamo que mi vida necesitaba. "A new day has come"

Uriel y Alexis: Por que su presencia en mi vida impulsó mi deseo de ser madre.

MIS PADRES.

Mamá por ser amiga y confidente y por todo el apoyo que me brindas desde las 5:00 am hasta las 00:00 am día con día. Hoy que soy madre sé que tengo un excelente ejemplo a seguir.

Papà que eres ejemplo de constancia y esfuerzo. Por todo el amor hacía mi y hacia mi hijo gracias por acompañarlo en sus juegos.

EL PRESENTE ESTUDIO SE LLEVO A CABO EN EL DEPARTAMENTO DE
INFECTOLOGIA E INMUNOLOGIA PERINATAL DEL INSTITUTO NACIONAL
DE PERINATOLOGIA ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES, INSTITUTOS
NACIONALES DE SALUD SSA.

RESUMEN.

INTRODUCCION. En las Unidades de Cuidados intensivos Neonatales la sepsis neonatal representa uno de los problemas de mayor impacto económico y con un potencial elevado de desarrollo de muerte o secuelas severas en las funciones respiratoria, neurológica y cardiovascular.

En el INPer la etiología de la Sepsis neonatal en un 43-44 % (1,2) y hasta un 62% de los casos de meningitis es debida a *Staphylococcus coagulasa negativa*, (1,2) debido a que estos son causales de morbilidad en aquellos pacientes con enfermedades crónicas o con estados de inmunosupresión.

Actualmente desde 1998 se utiliza a Vancomicina como principal opción ante la presencia de sepsis neonatal (3) cuando se tiene el aislamiento de *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) dada la emergencia de resistencia a meticilina reportada a nivel mundial desde la década de 1960 (3,4). La heteroresistencia es una característica distintiva de dicha resistencia a meticilina, (4) que ha sido ya reportada también a Vancomicina por varios autores a nivel mundial.

En este patrón el nivel de resistencia varía dependiendo de las condiciones del cultivo encontrando un patrón heterogéneo de susceptibilidad y resistencia ante β -lactámicos siendo aquellas cepas resistentes a β -lactamasas cepas que tienden a desarrollar alteraciones en la resistencia fenotípica por selección de clonas mutantes altamente resistentes, lo que le confiere la capacidad de crecer en presencia de altas concentraciones de meticilina y actualmente de Vancomicina. (4)

OBJETIVO El objetivo del presente estudio fue realizar una búsqueda de heteroresistencia a Vancomicina de cepas de *Staphylococcus* aisladas de pacientes con diagnóstico clínico de sepsis y valorar su repercusión clínica mediante su evolución posterior al inicio del tratamiento con el glucopéptido.

MATERIAL Y METODOS

Mediante la revisión de expedientes se identificaron 182 pacientes con diagnóstico de sepsis neonatal por SCN a partir del año 2002 y hasta 2005, posteriormente se procedió a recuperar las cepas viables de dichos pacientes y de estas se identificaron únicamente aquellas cuyo crecimiento se dio en forma pura (sin contaminante y correspondiente con el aislamiento reportado) quedando 30 cepas viables y puras las cuales se inocularon en placas de BHI con vancomicina a 4 μ g/ml colocando un sensidisco de aztreonam de

30µg, incubándolas durante 48 horas, aquellas cepas que crecieron alrededor del disco de aztreonam se tomaron para la prueba de estabilidad a vancomicina con diferentes concentraciones (0,2,4,8 y 16µg de vancomicina) Se obtuvieron 2 con heteroresistencia (crecimiento con 8µg de vancomicina).

La valoración clínica se realizó mediante la revisión de expedientes tomando en cuenta los parámetros propuestos por Bone para sepsis neonatal y se recabaron datos de estos mismos parámetros una vez iniciado el tratamiento con vancomicina.

RESULTADOS

El promedio de estancia hospitalaria previa al inicio de manifestaciones de sepsis fue de 16 días, La fuente del aislamiento fue en 97% de hemocultivo central en 6% se obtuvo además de hemocultivo aislamiento en líquido cefalorraquídeo. Las variables observadas con mayor frecuencia Acidosis metabólica (50%), fiebre o hipotermia, la presencia de bandemia (45.4%). Las variables que persistieron pese a más de 72 hrs con tratamiento de Vancomicina fueron bandemia, acidosis metabólica y distermias.

CONCLUSIONES.

Se demuestra tal como lo reporta la literatura mundial que el desarrollo de heteroresistencia puede llevar al fracaso terapéutico con Vancomicina, es necesario ampliar la muestra y determinar patrones de clonalidad ya que esto puede generar resistencia primaria dentro del Instituto Nacional de Perinatología que conlleve a un cambio en el patrón de comportamiento clínico de los pacientes con sepsis neonatal intrahospitalaria.

INTRODUCCION

Los *Staphylococcus Coagulasa Negativa (SCN)* pertenecen a la familia de *Micrococacea*, género *Micrococcus*,(5) es una bacteria ubicua, Gram positiva aerobia o anaerobia facultativa, no capsulada, no esporulada, no móvil que se agrupa en conglomerados en forma de racimo de uvas tétradas o en cadenas.

En el medio de cultivo forman colonias relativamente grandes de 2 a 3 mm después de incubarlas a 35°C durante 4 horas, o hasta 7 mm después de 48 a 72 hrs de incubación. Son opacas y convexas, de consistencia cremosa o blanquecinas o con alguna gama de tonos amarillos, algunas cepas son capaces de producir beta hemólisis, varias colonias pequeñas pudieran ser confundidas con ciertos *Streptococos* de los cuales se diferencia fácilmente mediante la prueba de la catalasa la cual suele ser positiva, de manera contraria a lo que ocurre con los *Streptococcus* (5,6)

Se distinguen de *S.aureus* por la prueba de catalasa y su gran ubicuidad es debida a que pueden sobrevivir en fomites durante semanas. Forman parte de la microbiota normal de la piel, pero cuando se presenta un estado de inmunosupresión severo pueden desarrollar infección sistémica hasta 50-70% de los individuos colonizados por ellos.(4)

Los SCN son los principales agentes bacterianos causantes de infección neonatal de presentación tardía (edad mayor de 72 hrs) y por consecuencia son causantes de infecciones intrahospitalarias en las UCIN. Son bacterias cuya participación como patógenos en humanos se ha reconocido a través de los años. En la actualidad la infección por estas es uno de los principales problemas en las unidades de cuidados intensivos pediátricos y centros hospitalarios en todo el mundo. El espectro clínico de las infecciones causadas por SCN incluyendo los cuadros ocasionados por cepas resistentes varían de acuerdo al sitio de infección que se presenta, y al patrón de resistencia antimicrobiana que dan como resultado tanto enfermedades leves como graves (8,9,10,11)

Al menos la significancia clínica de SCN aislados de cultivos puede ser difícil de determinar, los miembros de estas especies se han asociado con el incremento en el número de infecciones adquiridas intrahospitalariamente, el incremento en el uso de maniobras invasivas, tales como catéteres y el incremento en el número de pacientes con inmunosupresión han contribuido a la infección por SCN. (8,9,43)

Existen al menos 20 especies de SCN que en ocasiones son considerados como un grupo único algunas especies son más resistentes a los antimicrobianos usados que otras.

La vancomicina es un agente importante para tratamiento en pacientes cuyos aislamientos resultan resistentes a oxacilina sin embargo la disminución en la susceptibilidad de aislamientos de SCN a vancomicina, en particular limita las opciones terapéuticas (12,13,14). En la actualidad, la importancia de SCN además del papel primario como agentes de infección neonatal se debe a que han sido uno de los responsables para la modificación de los esquemas antimicrobianos utilizados en diferentes zonas geográficas; debido a la resistencia a meticilina que se considera que va del 60% al 71.7%, y que en su mayoría se brinda tratamiento con vancomicina.

Debido a la presencia de cepas resistentes a vancomicina algunas regiones geográficas ha sido necesaria la regulación en la prescripción de glucopéptidos ya que en estudios moleculares se han amplificado fenotipos de heteroresistencia de *Staphylococcus* confirmando así la existencia de estas cepas (15).

La vancomicina fue el primer antibiótico glucopéptido, y es el más ampliamente usado, tiene actividad principalmente contra bacterias aerobias Gram positivas. Es activa contra *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a oxacilina, SCN, *Streptococcus*, *S. pneumoniae* sensibles y resistentes a ceftriaxona y contra *Enterococcus* incluyendo los resistentes a gentamicina.

Cuenta con varios mecanismos de acción el principal es el bloqueo físico de los substratos más importantes de la síntesis de la pared celular y prohíbe el proceso posterior de estos substratos a estadios posteriores de la biosíntesis de la pared celular: en particular los *Staphylococcus* tienen una acetilación (16) en el carbono 6 de ácido murámico, la amidación de un alfa carboxilo y la unión de un puente interpéptido de cinco residuos de glicina en el grupo amino de la posición 3 de lisina esto lo hace formando una "cadena" a la que por afinidad de un péptido con dichos aminoácidos se une la vancomicina impidiendo la formación completa de la misma. Este péptido son moléculas D-ala D-ala y es el que impide los pasos de transglucosilación y transpeptidación debido a que las enzimas no pueden interactuar correctamente con el substrato bloqueado lo que resulta en una pared celular débil y poco funcional lo que conduce a muerte celular bacteriana. (17)

En *Enterococcus* la vancomicina daña la permeabilidad de membranas y la síntesis de RNA en conjunto con la inhibición de la formación de peptidoglicano el componente principal de la pared celular bacteriana, La resistencia a este glucopeptido en los enterococos ocurre cuando se produce una enzima que modifica su sitio blanco principal, cambiando de D-alanil-Dalanina a D-alanil- lactato. Existen genes de resistencia denominados *Van A*, *Van B*, *VanC* y *Van D* como responsables de la resistencia a glucopeptidos.

El gen Van A es el más común y afecta tanto a Vancomicina como a teicoplanina, este gen de resistencia se localiza en un plásmido el cual tiene la función de sintetizar precursores del peptidoglicano de la pared celular formando un pentapéptido en lugar de D-alanil-D-alanina, lo que ocasiona una pobre afinidad del glucopeptido hacia este depsipeptido. El gen Van B afecta únicamente la actividad antibacteriana de vancomicina y respeta la de teicoplanina. Este gen es transferible pero se encuentra en el cromosoma bacteriano. El gen Van C es similar al anterior, ya que es transferible y el último Gen Gen D es raro que se observe y afecta ambos glucopeptidos. En la actualidad la búsqueda de estos genes se ha hecho imperativa en cepas de especies de *Enterococcus* mientras que en cepas de especies de *Stafilococcus* la presencia de tales genes no ha sido reportada. (18-21).

Cuando se producen enzimas que modifican el sitio blanco de Vancomicina ocurre resistencia a vancomicina, cambiando de D-alanil-D-alanina a D-alanil- lactato. Existen genes de resistencia denominados *Van A*, *Van B*, *Van C* y *Van D* como responsables de la resistencia a glucopeptidos. El gen *Van A* es el más común y afecta tanto a Vancomicina como a teicoplanina, este gen de resistencia se localiza en un plásmido el cual tiene la función de sintetizar precursores del peptidoglicano de la pared celular formando un pentapéptido en lugar de D-alanil-D-alanina, lo que ocasiona una pobre afinidad del glucopeptido hacia este depsipeptido.

El gen *Van B* afecta únicamente la actividad antibacteriana de vancomicina y respeta la de teicoplanina. Este gen es transferible pero se encuentra en el cromosoma bacteriano.

El gen *Van C* es similar al anterior, ya que es transferible y el último Gen Van D es raro que se observe y afecta ambos glucopéptidos. En la actualidad la búsqueda de estos genes se ha hecho imperativa en cepas de especies de *Enterococcus* mientras que en cepas de especies de *Staphylococcus* la búsqueda de ellos no ha sido reportada. (18,-21).

La detección de la resistencia a vancomicina de los *Staphylococcus* puede ser difícil al igual que la resistencia a oxacilina por lo que ha incrementado la importancia clínica.

(5)

En *Staphylococcus* el mecanismo exacto de resistencia a vancomicina aún no se conoce, aunque luego de los estudios moleculares realizados por Hiramatsu (30) se cree que la transferencia mediante plásmidos de estos genes de *Enterococcus* a *Staphylococcus* sea la responsable

Heteroresistencia es un término acuñado para definir la presencia de una pequeña fracción de bacterias que en un cultivo muestran resistencia, una característica que es mediada cromosómicamente en la que las células resistentes crecen más lentamente que las bacterias susceptibles. Una característica es que ésta es mediada cromosómicamente. Esta expresión heterogénea puede conducir a un error de muestreo que comprometa la detección de resistencia en el laboratorio

Las cepas con heteroresistencia a Vancomicina particularmente son aquellas cepas que *in vitro* desarrollan crecimiento en presencia de este antibiótico a una concentración de 8 a 16 $\mu\text{g/ml}$ luego de haber sido sometidas a selección positiva con β -lactámicos. Este método tiene su fundamento en la resistencia encontrada a meticilina debido a que se han encontrado mutaciones fenotípicas que les confieren resistencia a *Staphylococcus* contra β -lactámicos por la transferencia de genes de alta resistencia a imipenem. (23 y 36)

La resistencia heterogénea puede ser deficiente en ausencia o presencia de un factor crítico en su vía bioquímica, posiblemente en la síntesis de su pared celular para lo que es importante la función de PBP 2^a la cual es una proteína "extraña". Su afinidad difiere entre varios antibióticos y existe resistencia cruzada ya que existe una relación entre la concentración de fármaco que se une a PBP2a y la MIC para la mayor parte de la población bacteriana proporcionando alta efectividad a algunos antibióticos estables a β -lactamasas. Sin embargo se ha demostrado que los *Staphylococcus* pueden ser capaces de hidrolizar PBPs desarrollando además cepas altamente resistentes una vez que se han expuesto a β -lactámicos. (23-25)

Los genes desarrollados por *Enterococcus* (previamente descritos) tipo *van* han sido introducidos de manera experimental en *Staphylococcus* siendo completamente funcionales, confiriendo resistencia a vancomicina.

Se ha observado que aquellas cepas que contienen el gen *van A* tienden al adelgazamiento de la pared celular que se correlaciona con el incremento de las concentraciones de Vancomicina, secuestrando moléculas de unión a vancomicina, lo que disminuye su susceptibilidad a este antibiótico (23, 25,36)

Aquellos aislamientos con disminución en la susceptibilidad a gluco péptidos bajo dichas condiciones se consideran cepas heteroresistentes. (22) Las células de crecimiento *in vitro* en un cultivo que expresa resistencia a vancomicina pueden ser difíciles de detectar usando métodos de susceptibilidad comunes, por esa razón los SCN aislados y que se reportan con MICs a vancomicina de 8-16 mg/ml (intermedio) son importantes para detectar la heteroresistencia. En la actualidad se han reportado aislamientos de *S. haemolyticus* y *S. epidermidis* con disminución a la susceptibilidad a glucopeptidos. Los métodos de susceptibilidad convencionales no pueden detectar aislamientos con SCN de susceptibilidad disminuida a gluco péptidos. La prueba de Kirby Bauer (difusión en disco) y el método automatizado de MicroScan no pueden detectar estos aislamientos (23). En algunas poblaciones, los patrones de heteroresistencia a vancomicina se han asociado a fallas terapéuticas en UCIN (24-26) y de manera anecdótica se ha reportado el tratamiento con esquemas potenciados con rifampicina; tratando de disminuir la exposición de los SCN a gluco péptidos. (25)

Además se han demostrado por medio de electroforesis en campos pulsados un alto porcentaje de clonas de alta virulencia y de clonas causantes del mayor porcentaje de las infecciones mediante Mec A DNA (28,29). Estudios previos de tipificación molecular han revelado que 45% de SCN de un solo tipo de cepas causan septicemia (24). Los datos reportados de heteroresistencia a vancomicina contrastan con las recomendaciones de administración profiláctica de este antibiótico para evitar infecciones por SCN en pacientes neonatos, ya que aparentemente disminuye la frecuencia de infección, sin embargo, el impacto en la resistencia antimicrobiana, no puede ser valorada a priori.

Los SCN con disminución en la susceptibilidad a vancomicina y teicoplanina han limitado las opciones de tratamiento y requieren precauciones en el control infeccioso para disminuir la transmisión y reducir las infecciones (25).

El conocimiento oportuno de las características de resistencia de los microorganismos mas importantes causantes de sepsis neonatal en nuestro medio, está justificado en el uso cotidiano y constante de glucopéptidos en pacientes con infección documentada o sospecha de infección, lo que establece una exposición constante de cepas a glucopéptidos a cepas de SCN, por lo que si se establece la presencia de

heteroresistencia y con esta la necesidad de nuevas alternativas para el tratamiento o de un control estricto en la administración de este antibiótico puede estar indicado(26)

A nivel mundial los estudios con búsqueda de heteroresistencia han reportado del 4 a 6% de cepas de *SCN* con heteroresistencia atribuyéndose una mortalidad de hasta el 14% de los casos neonatales con diagnóstico de sepsis. (29-37)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Existirá heteroresistencia a Vancomicina en las cepas de Staphylococcus provenientes de recién nacidos sépticos internados en UCIN en el Instituto Nacional de Perinatología?

JUSTIFICACION

Los SCN representan un 41.3% del total de los agentes etiológicos de Sepsis intrahospitalaria encontrados en la UCIN del Instituto Nacional de Perinatología; cuentan con alto potencial de diseminación debido a que forman parte de la microbiota normal de la piel y de los microecosistemas hospitalarios. En nuestro medio las cifras de pacientes afectados sobrepasan incluso los reportes de otras instituciones mexicanas, donde la mayor frecuencia de agentes infecciosos corresponden a enterobacterias. (2)

Basados en el patrón de resistencia a meticilina, la opción terapéutica son los glucopéptidos que es el justificante para realizar el cambio de antibióticos una vez que se sospecha de infección nosocomial, además de que son agentes ya reconocidos como causa de choque séptico en los neonatos presentando una elevada frecuencia de morbimortalidad asociada así como secuelas posteriores.

Se han reportado a nivel mundial cepas de *Staphylococcus* resistentes a Vancomicina desde 1997.(36,37,38) Dado que la opción terapéutica en estos casos es reducida a dicho glucopéptido es importante conocer el comportamiento de las cepas provenientes de hemocultivos de pacientes sépticos y valorar su potencial de desarrollo de heteroresistencia para prevenir la diseminación intrahospitalaria de estos agentes.(39,40,41)

En el INPer la etiología de la Sepsis neonatal en un 43-44 % (1,2) y hasta un 62% de los casos de meningitis es debida a *Staphylococcus* coagulasa negativa, debido a que estos son causales de morbilidad en aquellos pacientes con enfermedades crónicas o con estados de inmunosupresión. (42,43)

Actualmente desde 1998(se utiliza a Vancomicina como principal opción ante la presencia de sepsis neonatal cuando se tiene el aislamiento de *Staphylococcus* coagulasa negativa dada la emergencia de resistencia a metilina reportada a nivel mundial desde la década de 1960. (45-50)

OBJETIVOS.

1. Conocer si existen cepas de SCN heteroresistentes a Vancomicina en la UCIN del INPer
2. Conocer si la evolución clínica de pacientes infectados con cepas heteroresistentes es diferente en comparación a los SCN susceptibles a vancomicina.

HIPOTESIS.

Existe un reporte a nivel mundial del 4-6% de cepas con heteroresistencia a Vancomicina en SCN. En el INPer los SCN son los agentes aislados con mayor frecuencia en sepsis neonatal de orden nosocomial, y el tratamiento de elección es Vancomicina; entonces se espera que en el INPer existan cepas heteroresistentes en el mismo 6% que se reporta a nivel mundial.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

MATERIAL Y METODOS.

El presente estudio se dividió en dos partes:

- 1) La primera parte consistió en la identificación de cepas de SCN heteroresistentes a vancomicina.
- 2) La segunda fase fue la búsqueda de las características demográficas, datos clínicos y de laboratorio de pacientes con diagnóstico de Sepsis.

Realizado en el Instituto Nacional de Perinatología en el laboratorio de microbiología Se obtuvieron los registros de los pacientes con aislamientos de SCN en hemocultivo y LCR a partir del año 2002 y se procedió a la identificación de pacientes neonatos para la posterior consulta de los expedientes de estos pacientes en busca de los siguientes criterios:

1) CRITERIOS DE INCLUSION

Se incluyeron todas las cepas aisladas a partir de Sangre o LCR de pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos neonatales con diagnóstico de sepsis que se encuentren viables y que clínicamente presentaran sepsis tomando como datos positivos para el diagnóstico de Sepsis:

- a) Leucocitosis o leucopenia,
- b) Bandemia, relación de bandas/neutrófilos de 0.20 (más de 10% de bandas totales y leucocitosis arriba de 12,000 o menor a 4000)
- c) Fiebre o hipotermia
- d) Nutrición parenteral total más de 14 días.
- e) Trombocitopenia
- f) Desarrollo de síndrome de Dificultad respiratoria,
- g) Taquicardia en ausencia de fiebre..
- h) Presencia de acidosis metabólica,
- i) Apnea
- j) Cianosis
- k) Estancia hospitalaria mayor a 48 hrs.

2) CRITERIOS DE EXCLUSION

- a) Aislamiento de más de un microorganismo
- b) Aislamiento sin datos clínicos de sepsis
- c) Pacientes con tratamiento antibiótico
- d) Recién nacido con al menos 15 días de tratamiento antimicrobiano previo al aislamiento
- e) Expediente incompleto.
- f) Pacientes que no hayan recibido tratamiento con Vancomicina pese al aislamiento obtenido.

VARIABLES EN ESTUDIO .Variables cualitativas categóricas: Sensibilidad antimicrobiana: Sensible o heterorresistente.

Variables dependientes: heteroresistencia; Sepsis, tiempo de evolución. Infección nosocomial

Variables independientes: Crecimiento en presencia de vancomicina, Fiebre, hipotermia, taquicardia, acidosis, apnea, cianosis, trombocitopenia. Estancia hospitalaria mayor a 48 hrs.

Una vez identificados estos pacientes, se realizó la búsqueda de aquellos que hubiesen tenido aislamiento ya sea en muestra de Sangre o de Líquido cefalorraquídeo (LCR) y de estos se seleccionaron únicamente aquellos cuyo reporte microbiológico correspondía a un SCN. Posteriormente se realizó una resiembra en Agar Sangre de Carnero de dichas cepas con el fin de corroborar la vialidad. Se corroboró la identificación de las cepas por medio de pruebas bioquímicas: Sacarosa, lactosa, manosa, trehalosa, fructosa, xilosa, urea, y manitol, además de coagulasa y se corroboró tanto el aislamiento único además de corroborar con el aislamiento inicial la subespecie de SCN Se recabó del sistema de base de datos en el INPer (sistema-AUD) el perfil de sensibilidad.

La recuperación de cepas se realizó bajo el siguiente procedimiento:

1. Se sembraron las cepas en el medio de cultivo de Sangre de Carnero para posterior incubación en estufa de CO₂ a 37°C durante 18 hrs.
2. Se Realizó identificación mediante pruebas bioquímicas con azúcares: Maltosa, manosa, sacarosa, fructosa, threalosa, xilosa, así como manitol y caldo y se incubaron a 37° durante 24 hrs. Revisar el crecimiento de cepas viables y puras.

Estudio de heteroresistencia a Vancomicina Debido a la naturaleza heterogénea de las cepas resistentes a meticilina (es decir el nivel de resistencia varía de acuerdo a las condiciones del cultivo y al uso de antibióticos betalactámicos usados), así por ejemplo la temperatura de 37°C a 43°C favorece un patrón de heteroresistencia y suprime por completo la resistencia. Basados en este hecho, la búsqueda de heteroresistencia se realizó a partir de aislamientos cultivados a 37°C en Gelosa Sangre de Carnero e identificados como SCN para posteriormente ajustarlo a una concentración a 1 en el Nefelómetro de Mc Farland misma que se utilizó para inocular dos placas de Gelosa infusión cerebro corazón (BHI) las cuales fueron previamente preparadas con Vancomicina a razón de 4mg por litro, colocando posteriormente un disco de

Aztreonam de 30 μg sobre la placa de BHI dentro de los cinco minutos de la inoculación; para ser leídas 48 hrs después de la incubación a 37°C. Aquellas cepas que presentaron crecimiento alrededor del disco de aztreonam se consideraron como candidatas a heteroresistencia a Vancomicina.

Se definieron como cepas heteroresistentes aquellas con crecimiento en presencia de vancomicina a 8 y 16 $\mu\text{g}/\text{l}$

Prueba de estabilidad a Vancomicina de subcolonias resistentes a vancomicina

Las colonias de las cepas que crecieron en gelosa BHI conteniendo 4 mg de Vancomicina por litro se prepararon para la estabilidad de resistencia. Estas colonias se cultivaron cinco veces en forma consecutiva en Gelosa Sangre de Carnero libre de antibiótico, subsecuentemente la resistencia a Vancomicina se probó por 40 μl de plata de una suspensión con una equivalencia de turbidez equivalente a 2 McFarland sobre una placa de BHI conteniendo 0,2,4,8,16 μg por litro.

Una vez hecho esto se toman como positivas para heteroresistencia a aquellas que crezcan a concentración de 8 y 16 μg de Vancomicina.

Posterior a esta se procedió a identificar aquellos pacientes cuyos datos correspondieron a las cepas con desarrollo de heteroresistencia.

Análisis estadístico.

Se presenta análisis de estadística descriptiva.

RESULTADOS:

Se encontró registro de 182 pacientes con aislamiento de hemocultivo positivo para SCN, de los cuales se obtuvieron 68 (37%) cepas viables y puras, de las cuales, 35 (51%) cumplieron con los criterios de inclusión .

Características demográficas (ver tabla en anexo)

El promedio de días de estancia hospitalaria previos a los síntomas de Sepsis fue de 16.4, En cuanto a la Edad gestacional el promedio fue de 33 semanas, con un rango entre 28-39, y la moda fue de 30 SDG.

42% (n 15) de los pacientes tuvieron peso menor a 1500 gramos, y entre los que desarrollaron heteroresistencia un 50% (n 1). De los pacientes a quienes se aislaron cepas susceptibles 45.8% de los pacientes tuvieron este peso.

En 97% de los pacientes la fuente del aislamiento fue el hemocultivo, en 5% fueron ambos y en 3% sólo de LCR.

En cuanto a las características clínicas de sepsis se presenta a continuación en la siguiente tabla los hallazgos encontrados de los pacientes que presentaron heteroresistencia.

Características demográficas de los pacientes con heteroresistencia		
	PACIENTE 1	PACIENTE 2
Peso	< 1500 Gramos	1500 a 2000 gramos
Días de estancia intrahospitalaria	6	17
Edad gestacional	30 sdg	36
Leucocitosis o leucopenia	35000	1800
Bandemia RBN 0.20 (mas de 10% bandas totales)	0.1	0.20
Fiebre o hipotermia.	si	Si
SDR	si	Si
Taquicardia	180x'	160x'
Acidosis metabólica	Si *	si*
Apnea	si	Si
Cianosis	si	si

* Dato sólo referido por médico en expediente sin reporte del mismo.

DISCUSION

Ya se ha comentado ampliamente sobre el papel que tienen los SCN como causales de sepsis severa, en unidades de cuidados Intensivos, sobre todo Neonatales. Se han diseñado diferentes métodos (7) para la búsqueda de heteroresistencia a vancomicina, sin embargo el método único que ha demostrado utilidad es el de microdilución en Agar BHI disponible para predecir el comportamiento de estos agentes microbiológicos.(30,31) Dichos estudios han logrado demostrar una elevada prevalencia de infecciones nosocomiales con SCN y se les ha responsabilizado de cuadros severos donde las manifestaciones más importantes y evidentes son el desarrollo de Apneas, bradicardia, e inestabilidad en la temperatura, tal como se observa aquí; un estudio realizado por Vermont (31) en neonatos prematuros encuentra en concordancia con el trabajo presente que la acidosis metabólica persistente es uno de los datos que mas comúnmente se encuentran en pacientes con infección sistémica severa provocada por SCN y el asilamiento a partir de LCR demuestra en algunos estudios prospectivos que las infecciones por SCN son severas e invasivas en los neonatos prematuros que, por definición son vulnerables a este tipo de agentes.

Lo recomendado por el CDC como conducta una vez que logra identificarse la existencia de alta capacidad de resistencia en *Staphylococcus* debe tomarse en cuenta las siguientes medidas ante un aislamiento de SCN con MIC ≥ 4 mcg/ml (44)

SITUACIONES EN LAS QUE DEBE SUSPENDERSE EL USO DE VANCOMICINA.

- a) Uso rutinario de vancomicina como antibiótico profiláctico.
- b) Pacientes quirúrgicos sin antecedentes de alergias a betalactámicos
- c) Neonatos de peso extremadamente bajo al nacimiento.
- d) Pacientes con diálisis
- e) Pacientes con neutropenia.
- f) Pacientes con catéter venoso central
- g) Tratamiento antimicrobiano empírico
- h) Pacientes con neutropenia y fiebre
- i) Cultivo único periférico con aislamiento de SCN
- j) Pacientes colonizados con *S. aureus*
- k) Pacientes con infección por *Clostridium difficile*
- l) Pacientes con infecciones con gérmenes susceptibles a otros antibióticos.

Las recomendaciones que emite el CDC para el manejo de pacientes gravemente enfermos con infecciones sistémicas

DE LABORATORIO.

Asegurarse del aislamiento de germen único en estos cultivos.

Usar MIC con unas de las siguientes técnicas: a) microdilución, dilución en Agar, Difusión en Agar.

Volver a probar el aislamiento cuando sea posible.

CONTROL DE LA INFECCIÓN.

En Norteamérica notificar al CDC.

Aislar al paciente.

Disminuir el número del personal que atiende al paciente índice.

Localizar la fuente de la infección

Monitorizar contactos

Usar material de bioseguridad.

En dichos estudios una vez que se identifica la presencia de heteroresistencia se busca genotipificación de las cepas, encontrando las cepas patógenas aisladas a partir de las manos y fomites del personal que atiende las UCIN y encontrando diseminación intrahospitalaria, lo más preocupante es que estas clonas permanecen por periodos prolongados en las UCIN .

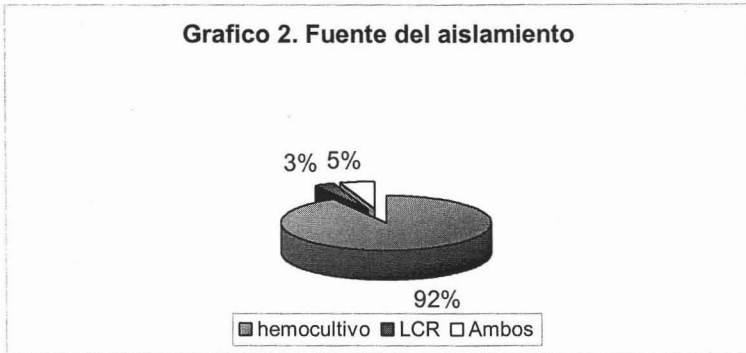
La principal limitante del presente estudio es la muestra de cepas tan pequeña una vez que se logró tener pureza y viabilidad, lo que reduce las posibilidades de asociación entre eventos adversos y presencia de heteroresistencia.

Una vez que en este trabajo se ha encontrado la presencia de cepas con heteroresistencia existentes en la UCIN el siguiente paso es ampliar la muestra para obtener resultados más confiables y paralelamente buscar clonalidad de estas cepas; lo que incrementaría la relación entre la observación del comportamiento de estos patógenos con el desarrollo de resistencia primaria.

Los estudios sobre epidemiología molecular han utilizado varios métodos de tipificación demostrando alteraciones tanto fenotípicas como genotípicas, sin embargo tienen mayor repercusión las variaciones genotípicas que las fenotípicas, el presente estudio puede servir como base una vez encontradas las cepas con heteroresistencia, para búsqueda de clonalidad.

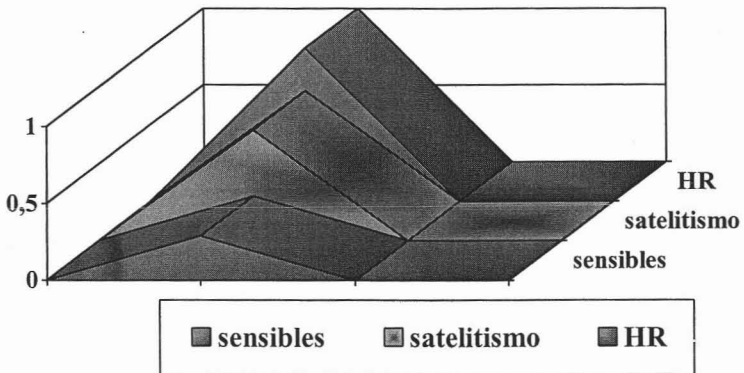
ANEXOS

Anexos gráficos

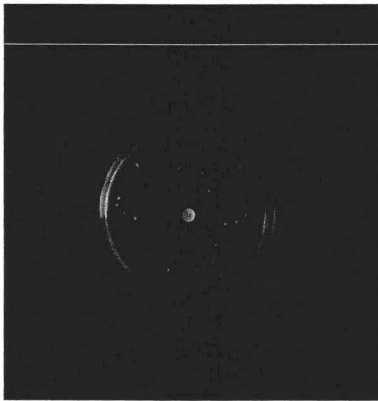
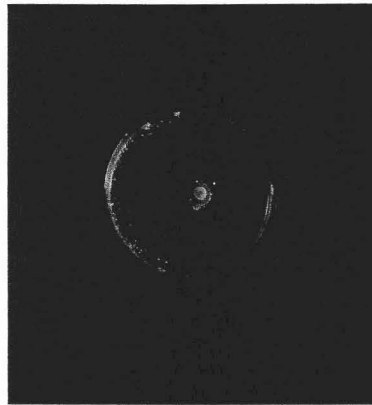
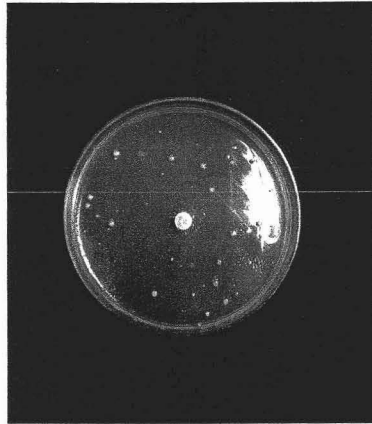


En este gráfico se muestra el 92% de los aislamientos de

Grafico 3 Presencia de acidosis metabólica



En este gráfico se comparan la presencia de acidosis metabólica entre los diferentes grupos. Se encontró como signo clínico predominante entre los pacientes con heteroresistencia comparados con los pacientes que solo desarrollaron satelitismo y aquellos que fueron sensibles a Vancomicina



Figuras 1,2 y 3 Cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativa con heteroresistencia

BIBLIOGRAFIA

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Reyna J, Ortíz FJ, Castro L, Limón AE. Identificación de marcadores clínicos y de laboratorio en recién nacidos pretérmino con diagnóstico de meningitis bacteriana neonatal. *Perinatología y reproducción humana* 2005; 19: 22-28.
2. Reyna J, Ortíz FJ, Limón AE, Plazola NG. Meningitis bacteriana en recién nacidos experiencia en el Instituto Nacional de perinatología de 1990 a 1999. *Bol Med Hosp. Infant Mex* 2004; 61:401-411.
3. Jain A, Ben Ami T, Staphylococcal infections in children: Part 2 *Pediatrics in review*. 1999;7:219-227.
4. Crossley KB, Archer GL. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill livingstone, 1997.
5. Sheagren JN. *Staphylococcus aureus : the persistent patogen*. *New Engl J of med* 1984;310:1368 -73.
6. Natchu RL, Nanda M, Kabra SK. Nosocomial infections in pediatric intensive care units. *Indian J pediatr* 2001, 68 : 1063 -1070.
7. De Silva GD, Justice A, Wilkinson AR, Buttery J, Herbert M, Day NP, Peacock SJ. Genetic population structure of coagulase negative staphylococci associated with carriage and disease in preterm infants *Clin Infect Dis J* 2001;33:1520-1528 (F)
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS approved standard 1999. M 100 S9 National Committee for Clinical Laboratory Standards,
9. Jain A, Ben Ami T, Staphylococcal infections in children: Part 3. *Pediatrics in review*. 1999; 8:261-265.
10. Sohn AH, Garret DO, Sinkowitz-Cochran RL, Gronhskopf LA, Levine GL, Stover BH, Siegel JD, Jarvis WR, prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: Results from the first national point prevalence survey. *J. Pediatr* 2001; 139: 821-827 (E).
11. Brumfit W, Hamilton MJ. Methicilin resistant *Staphylococcus aureus*. *New England Journal of medicine* 1989;320:1188-96.

12. Hussain FM, Boyle VS, Daumm RS. Community acquired methicilin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in healty children attending an outpatient pediatric clinic. *Pediatr Infect Dis J*.2001;20:763-767.
13. Van Der Zwet WC, Debets Ossenkopp YJ, Reinders E, Kapi M Savelkoul PH Van Elburg RM, Hiramatsu K, Vanderbrouke Grauls CM. Nosocomial spread of a *Staphylococcus Capitis* stain with heterorresistance to vancomycin in a neonate intensive care unit. *J clin Microbiol* 2002;40:2520-2525.
14. Wayne PA, Raymundo O Heusler H, Brhunn JB Suntrarachun S, Kelly N, Deighton MA, Garland SM. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus Coagulase negative* bacteremia in a newborn intensive care unit. *J Hosp Infect* 2002; 51:33-42 (D).
15. Sharma Rieder K, Jhonson LB, Kathib R. Molecular analysis of coagulase negative bacteremia. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1317-1323.
16. Craft AP, Finer NN Barrington KJ Vancomycin for profilaxis against sepsis in preterm neonates . *Cochrane Database Syst Rev* 2000; CD 001971 (I)
17. Garrett, D:O. E. Jochimsen K Murfitt, B. Hill, S. McAllister, P. Nelson RV Spera, RK. Sanll FC, Tecover J. Jhonston B. Zimmer W:R. Jarvis. The emergence of decreased suceptibility to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1999 ;20:167-170.
18. Schwalbe, R:S, JT Stapleton, Gilligan PGH, Emergence of vancomycin resistance in coagulase negative *Staphylococci*. *New England Journal of medicine* 1987. ;316:927-931.
19. Nandi Lozano ME, Perez Delgadillo MA, Avila Figueroa, Bacteremia and pseudobacteremia caused by coagulase negative *Staphylococcus* in children *Gac Med Mex* 2001;137:97-103 (H).
20. Tenover F.C, Lancaster MV, Hill C.D. Steward SA, Stocker G.A. Hancock CM, O'Hara, Mc Allister, SK, Clarck NC Hiramatsu Characterization of *Staphylococci* with reduced suceptibility to Vancomycin and other glucopeptides. *J Clin Microbiol* 1998 ;36(4):1020-1027.
21. Archer G.L. and M. W. Climo Antimicrobial Susceptibility of coagulase negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*,1994; 38:2231-2237.
22. Agarrwal RS Deorari A, Paul VK. Sepsis in the newborn. *Indian J Pediatr* 2001; 68:1143-7.
23. Asubel FM, Brent RE, Kingston D.D. Moore J:G: Seidman J:A: Smith and K Strhul 1995 . *Current protocols in molecular biology* p2.4.1Jhon Willey and Sons, Boston Mass.

24. Chambers H.F. Meticillin resistance in Staphylococci: molecular and clinical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997 ; 10:781-791.
25. Bingen, E.M.C. Barc N. Bahimi E, vilmer and Baufiles, Randomly amplified polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation of meticillin resistant coagulase negative staphylococcus bacteremia isolates in a pediatric hospital . *J. Clin. Microbiol.* 1995;33:1657-1659.
26. Hackbarth C. J. Chambers F:H. Meticillin resistant staphylococci: detection methods and treatment of infections. *Antimicrob Agents and Chemother* 1989;33:995-999.
27. Huebner J:G:B Pier, JN Maslow E, Muller H. Shiro, M Parent A, Kropec, R.D. Arbeit Goldman D.A Endemic nosocomial transmission of Staphylococcus epidermidis bacteremia isolates in a neonatal intensive care unit over 10 years. *J.Infect. Dis* 169:526-531.
28. McGowan J.E., Weinstein. The role of the laboratory control of nosocomial infection en Bennet y Brachmann Hospital Infection 1992 Little Brown Company pp187-220 .
29. Low D.E. Schmidt, Kirplani H:M, Moodie R, Kreiswirth B. An endemic strain of Staphylococcus haemolyticus colonizing and causing bacteremia in Pediatrics neonatal intensive care unit patients 1992 89:696-700.
30. Suzuki EK, Hiramatsu, Yokota T, Survey of meticillin resistant clinical strains of coagulase negative staphylococci for mecA gene distribution .*Antimicrob Agents Chemoter.* 1992;36:429-434.
31. Vermont CL, Hartwigth Fleer NG, Verbrugh H, Van Der Anker Persistence of clones of Coagulase negative staphylococci among premature neonates in neonatal intensive care unit two center study of bacterial genotyping and patient risk factors *J. Clin. Microbiol* 36:2485-2490.
32. Versolvic JT, Koeuth Lupinski Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res* 1991 ;19:6823-6831.
33. Villari PC, Sarnataro e Iacuzio L,. Molecular epidemiology of Staphylococcus epidermidis in a neonatal intensive care unit over a three year period *J. Clin. Microbiol* 38:1740-1746.
34. Shama A Patole SK Whitehall JS Intravenous rifampicin in neonates with persistent staphylococcal bacteremia. *Acta Pediatr* 2002; 91: 670-3.
35. Wong SY, Ho PL, Woo CY Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance *Clin Infect Dis* 1999; 29: 760-767.

36. Liu C, Chambers H:F. Staphylococcus aureus with Heterogenous resistance to Vancomycin Epidemiology, Clinical Significance and critical Assessment of diagnostic methods. Antimicrob Agen Chemother2003;47:3040-3045.
37. Christoff VB, Peters G, Heimann C. Pathogenesis of infectious due to coagulase negative staphylococci. The Lancet infectious diseases; 2002; 2:38-43.
38. Doubreux B, Reverdy E, Nervi C, Rougier A, Bolmstrom F, Vandenesch F, Etienne J. Cilinical isolate of vancomycin heterointermediate Staphylococcus aureus susceptible to meticillin and in Vitro selection of a Vancomiicin resistant derivative Antimicrob Agent Chemother 2001; 45: 349-352.
39. Centers for disease control and prevention 2002: Vancomycin resistant Staphylococcus aureus United States Morb Mortal Weekly report ; 51:902.
40. Reverdy ME, Jarraud S, Doubreux B, Burel E, Girardo P, lina G, Ettiene J, Inckidence of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to glycopeptides in two French hospitals Clin Microbiol Infect 2001; 7; 257-262.
41. Moise P y Shentag J. Vancomycin treatment failures in Staphylococcus aureus lower respiratory tract infections Int. Antimicrob Agent 2000; 16: (suppl) S31-S34.
42. Moore M:R:F, Perdreau-Remington, Chambers HF. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin –intermediate Staphylococcus aureus in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis Antimicrob Agents Chemother 2003;47: 1262-66-
43. Geisel R, Schmitz F.J. Fluitt A.C, Labschinzki H. Emergence, mechanism and clinical implications of reduced glucopeptide susceptibility in *Saphylococcust*
44. CDC. Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. MMWR 1997;46:626–8,635.
45. Nakiopoglu, Derbentli S, Cagatay A Katrancy Investigation of Staphylococcus strains with heterogeneous resistance to glycopeptides in a Turkish university hospital BMC Infectious Diseases 2005,5 :1471-2334
46. Center KJ, Reboli AC, Hubler G, Rodgers GL, Long S Decreased Vancomycin Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci in a Neonatal Intensive Care Unit:Evidence of Spread of Staphylococcus warneri Jou Clin Microbiol. 2003; 41: 4660-4665
47. Ross, Fuss, Harrington, SM. Cai,. M. Perl, Merz WG. Methicillin-Resistant Staphylococcus caprae in a Neonatal Intensive Care Unit. J Clin Microbiol. 2005; 43:363-367.

48. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster M V, Robinson B, TenoverFJ Zervos M, Band J, White E, Jarvis JW Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. The New England Journal of Medicine 1999; 340:493-501.